

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Dr. Wolf-Georg F o r s s m a n n in
30175 Hannover hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)"

am 28. September 1994 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K 14/635, C 07 K 7/06, A 61 K 49/00 und
G 01 N 33/53 der Internationalen Patentklassifikation erhal-
ten.

München, den 9. Oktober 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Agurks

Aktenzeichen: P 44 34 551.8

PRIORITY DOCUMENT

Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH.

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für N-terminales Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10^{-12} mol/L gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmuno-metric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sor-bent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

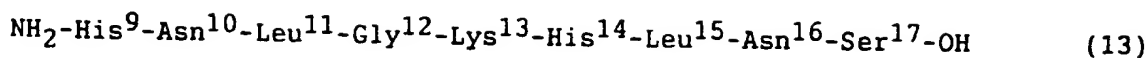
körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.

Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.

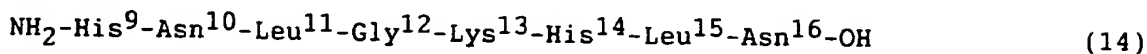
Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:

- hPTH 1-10
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH (1)
- hPTH 1-9
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH (2)
- hPTH 1-8
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH (3)
- hPTH 1-7
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH (4)
- hPTH 1-6
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH (5)
- hPTH 1-5
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH (6)
- hPTH 9-18
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (7)
- hPTH 10-18
NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)
- hPTH 11-18
NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)
- hPTH 12-18
NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)
- hPTH 13-18
NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)
- hPTH 14-18
NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

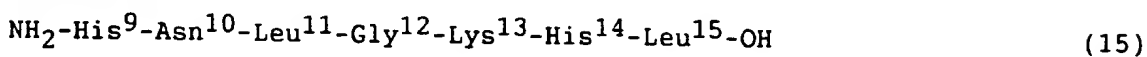
hPTH 9-17



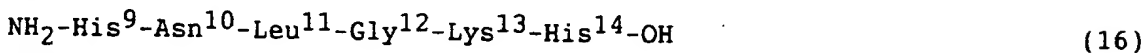
hPTH 9-16



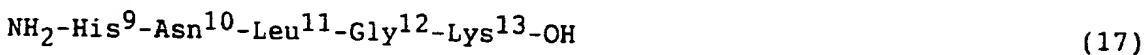
hPTH 9-15



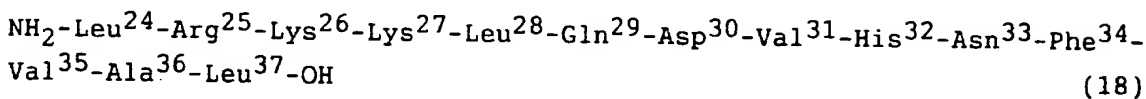
hPTH 9-14



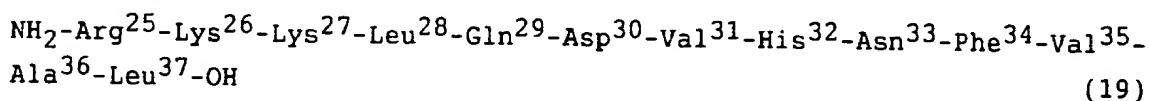
hPTH 9-13



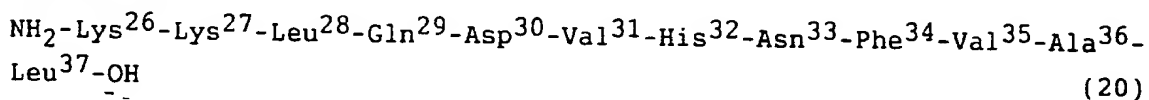
hPTH 24-37



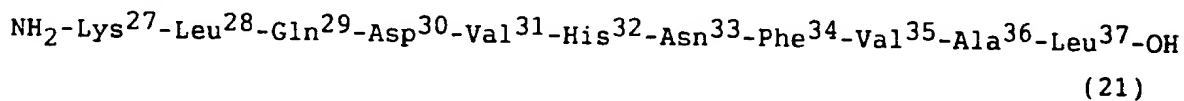
hPTH 25-37



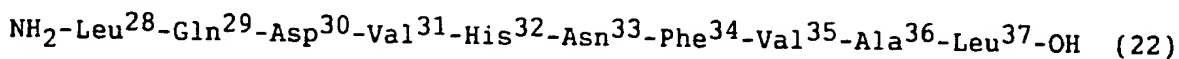
hPTH 26-37



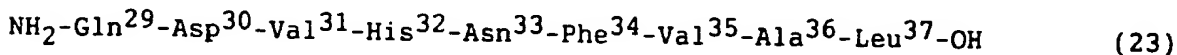
hPTH 27-37



hPTH 28-37

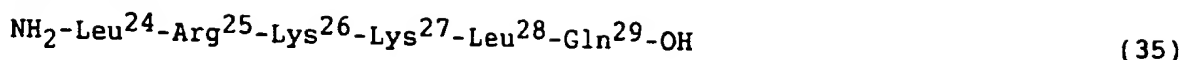


hPTH 29-37

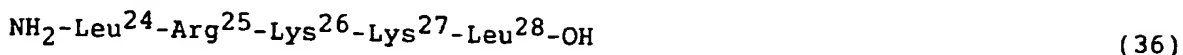


- hPTH 30-37
NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)
- hPTH 31-37
NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)
- hPTH 32-37
NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)
- hPTH 33-37
NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)
- hPTH 24-36
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)
- hPTH 24-35
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)
- hPTH 24-34
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-OH (30)
- hPTH 24-33
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-OH (31)
- hPTH 24-32
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)
- hPTH 24-31
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)
- hPTH 24-30
NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)

hPTH 24-29



hPTH 24-28



Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerlässlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem so weit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder Serumalbumin, Ovalalbumin oder Mauserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fractionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_c auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcar-

bodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, ~~Fmoc-~~Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazbicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder

Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylether ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wässriger Lösung lyophilisiert.

Beispiel 2

Reinigung und Analyse

Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

Reinheit der Produkte werden durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

Beispiel 3

Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder-serumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

Beispiel 4

Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin , gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

Beispiel 5

Immunisierung

Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.
2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz
hPTH-1-10
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-OH}$ (1)
hPTH 1-9
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-OH}$ (2)
hPTH 1-8
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-OH}$ (3)
hPTH 1-7
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$ (4)
hPTH 1-6
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$ (5)
hPTH 1-5
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$ (6)
hPTH 9-18
 $\text{NH}_2\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-Leu}^{11}\text{-Gly}^{12}\text{-Lys}^{13}\text{-His}^{14}\text{-Leu}^{15}\text{-Asn}^{16}\text{-Ser}^{17}\text{-Met}^{18}\text{-OH}$ (7)

hPTH 10-18

NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)

hPTH 11-18

NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)

hPTH 12-18

NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)

hPTH 13-18

NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)

hPTH 14-18

NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (21)

hPTH 28-37

NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-
OH (22)

hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-OH (30)

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
OH (31)

hPTH 24-32

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

hPTH 24-30

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH (35)

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH (36)

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.

4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immunisierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ein Diagnostikum und Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den erfindungsgemäßen Peptiden.

